

Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН

PONTUS EUXINUS
ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ : XI



ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ – 2019

XI Всероссийская научно-практическая конференция для молодых
учёных по проблемам водных экосистем,

посвященная памяти д.б.н., проф. С. Б. Гулина

Материалы конференции

Севастополь, 23–27 сентября 2019 г.

Севастополь
ФИЦ ИнБЮМ

2019

0,376 мкг/г (при ПДК - 0,5) отмечена в тканях особей, выловленных в протоках р. Обь в границах Каменского района.

После введения санкций в 2014 году импорт рыбы в Россию сократился почти в 2 раза, и в рыбной промышленности стала реализовываться политика импортозамещения. В стране в целом, и в Алтайском крае в частности создаются условия для развития рыбохозяйственной отрасли - наращивание технического потенциала крупных и мелких предприятий-рыбозаготовителей и переработчиков, и введение в промысел ранее не используемых водных объектов. Серебряный карась реки Обь, отличающийся отсутствием опасных для человека паразитов и сравнительно низким содержанием тяжелых металлов, в совокупности с его высокой численностью, является одним из наиболее перспективных промысловых видов.

Список литературы

1. Водоемы Алтайского края: биологическая продуктивность и перспективы использования / отв. ред. В. П. Соловов. Новосибирск : Наука, 1999. 285 с.
2. Романенко Г. А. Современное состояние карася в различных озерных системах Алтайского края // Водные биологические ресурсы России: состояние, мониторинг, управление. Петропавловск-Камчатский : КамчатНИРО, 2017. С. 106–111.
3. Матковский А. К. Алгоритмы метода «восстановленного запаса рыб» для изучения изменения промыслового запаса и прогнозирования общедопустимых уловов (ОДУ) на примере обского чира (*Coregonus nasus* (Pallas)) // Биология, биотехника разведения и промышленного выращивания сиговых рыб. Тюмень, 2001. С. 95–98.

ПРИМЕНИМОСТЬ ВИТАЛЬНОГО КРАСИТЕЛЯ НИЛЬСКОГО КРАСНОГО ДЛЯ ЭКСПРЕСС ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КЛЕТКАХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Соломонова Е.С., Железнова С.Н.

Федеральный исследовательский центр "Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь

Ключевые слова: микроводоросли, проточная цитометрия, нильский красный, липиды

Методы определения содержания липидов в клетках водорослей отличается большой трудозатратностью и времяёмкостью. Традиционно для данной цели используют гравиметрический [1] и спектрофотометрический [2]. Появление современных методов, в частности метода проточной цитометрии в комбинации с различными витальными красителями даёт возможность быстрой и достаточно точной оценки липидного комплекса у микроводорослей. В таких исследованиях широко применяется флуоресцентный краситель Нильский красный (Nile Red) [3]. Данный краситель относится к так называемым флуоресцентным зондам, при добавлении его к липидосодержащим клеткам его молекулы связываются с липидами, а из параметров флуоресценции можно извлечь определенную информацию о структуре и функции данных биологических объектов. Однако, в литературе встречаются многочисленные протоколы окрашивания микроводорослей, согласно которым необходимо: а) строго контролировать добавляемую концентрацию NR в исследуемую пробу и б) подбирать необходимое время окрашивания для выбранного объекта исследования.

Цель настоящей работы заключалась в выборе оптимальных условий окраски Нильским красным для оценки липидного комплекса различных видов микроводорослей, а также сопоставление с традиционным методом оценки липидов.

Для построения калибровочной кривой использовали различные культуры микроводорослей, выращенные в различных условиях среды. Опыты ставили в 3 повторностях. Для цитометрического анализа из культивационных сосудов отбирали пробы объёмом 3 мл.

Для определения относительного содержания липидов в клетках микроводорослей использовали флуоресцентный краситель нильский красный (Nile Red, максимумы возбуждения и эмиссии, соответственно, 488 и 640 нм, канал FL2). Рабочий раствор красителя готовили в диметилсульфоксиде (DMSO) (конечная концентрация 0.1 мг мл⁻¹) и хранили при +4°C в замороженном состоянии (температура плавления DMSO +18,5°C).

Содержание общих липидов исследуемых видов водорослей определяли колориметрическим сульфосфо-ванилиновым методом в модификации [1, 2]. Время сжигания пробы составило 20 мин. После добавления фосфо-ванилинового реактива и развития окраски определяли оптическую плотность проб на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 530 нм по стандартной формуле [1, 2].

В ходе эксперимента подбирали оптимальное время окрашивания и оптимальную концентрацию рабочего раствора нильского красного для окраски липидного комплекса микроводорослей. Для выбора оптимальной концентрации красителя использовали различные вариации концентраций от 3 до 50 мкл мл⁻¹. Для выбора оптимального времени проводили тестовые окраски от 1 до 20 мин. Показано, что после 7 минут окрашивания характер флуоресценции водорослей менялся незначительно. При продолжительности окраски более 20 мин флуоресценция FL2 оказывалась завышенной, вероятно, за счёт неспецифических свойств самого красителя. Оптимальное время окрашивания составило около 10 мин, поскольку при этом достигалась максимальная интенсивность окраски клеток и её наименьшая вариабельность. Оптимальная концентрация рабочего раствора Nile Red составила 20 мкл на 1 мл культуры. Следует отметить, что флуоресценция FL2 при добавлении свыше 25 мкл рабочего раствора возрастала незначительно.

Показана достоверная положительная корреляция между содержанием липидов в клетках водорослей, которое было рассчитано традиционным спектрофотометрическим методом и интенсивностью флуоресценции нильского красного (канал FL2), $R^2=0.98$.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-34-00672

Список литературы

1. Wawrik B., Harriman B. H. Rapid, colorimetric quantification of lipid from algal cultures // J. Microbiol. Meth. 80. № 3. 2010. P. 262–266.
2. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры / Под ред. А. И. Агатовой. Москва: ВНИРО, 2004.
3. Cooksey K. E. Guckert J. B., Williams S. A., Callis P. R. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red // J. Microbiol. Meth. 6. №. 6. 1987. P. 333–345.